پاسخ به داوری

با تشکر از داور محترم بابت زمانی که صرف مطالعه مقاله و ارائه پیشنهادات سازنده در راستای پربار کردن مقاله نموده‌اند. در ادامه پاسخ‌ها و تصحیحات متناسب با پیشنهادات انجام شده ارائه می‌شوند:

۱- مقاله فاقد قسمت نتیجه گیری هست.

پاراگراف انتهایی بحث مربوط به نتیجه گیری مقاله می‌باشد که عنوان مربوطه نیز درج شد. (صفحه ۱۷ سطر ۹)

۲- عنوان انگلیسی مناسب نیست و متناسب با عنوان فارسی اصلاح شود.

عنوان انگلیسی متناسب با عنوان فارسی تصحیح شد. (صفحه ۱ سطر ۹-۱۰ و صفحه ۳ سطر ۱-۲)

۳- لطفا در هر دسته داده از روش های کاهش ابعاد و نمودار های heatmap برای نمایش داده ها در فضای کاهش ابعاد یافته و روابط نمونه ها با هم استفاده شود.

نمودار heatmap برای تمام نمونه‌های موجود در دو مجموعه داده و برای ژن‌های مشترک شناسایی شده ایجاد شد و در بخش نتایج و به عنوان شکل ۳ به مقاله اضافه شد. تغییرات مربوطه در متن در بخش روشها و نتایج نیز به تناسب ایجاد شد. (صفحه ۶ سطر ۱۱-۱۲، صفحه ۹ و صفحه ۱۰ سطر ۱-۴)

۴- لطفا از نمودار volcano برای نمایش ژن ها با بیان متفاوت در هر دسته داده استفاده شود.

نمودار volcano برای هر مجموعه داده به طور جداگانه رسم شد و حد آستانه‌های مورد استفاده برای LFC و p-value نیز به صورت خطوط افقی و عمودی در نمودار اضافه گردید. نمودارهای ایجاد شده به عنوان شکل۲ در مقاله اضافه گردید. تغییرات مربوطه در متن در بخش روشها و نتایج نیز به تناسب ایجاد شد. (صفحه ۶ سطر ۸-۹ و صفحه ۸)

۵- پایگاه داده STRING برای شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین می باشد در حالیکه در کل متن با نام شبکه های تنظیم بیان ژن یاد شده است، که صحیح نمی باشد. برای ساخت شبکه های تنظیم بیان ژن نیاز به اطلاعات روابط Transcription factor و target gene است که در پایگاه داده STRING نمی باشد.

با تشکر از دقت نظر و پیشنهاد داور محترم در استفاده از اصطلاحات، در کل متن عبارت "شبکه تنظیم بیان ژنی" به "شبکه‌ی ژنی" تغییر یافت. با توجه به اینکه پروتئین محصول بیان ژن می‌باشد، می‌توان شبکه ژنی را مترادف شبکه میانکش پروتئین-پروتئین در نظر گرفت. چنین کاربردهایی به صورت گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد، به عنوان مثال همانطور که داور محترم نیز به آن اشراف دارند بخش قابل توجهی از اطلاعات پایگاه داده STRING که به عنوان پایگاه داده شبکه میانکنش پروتئین-پروتئین می‌باشد، از مطالعه هم بیانی داده‌های بیان ژن حاصل شده است. از این رو با توجه به اینکه داده‌های مورد استفاده در این مطالعه داده‌های بیان ژن هستند عبارت شبکه

ژنی در مقاله مورد استفاده قرار گرفت.

۶- در قسمت بحث مطالب تکراری دیده می شود. لطفا دوباره بررسی شود.

قسمت بحث مقاله مورد بازنگری قرار گرفت و بخش‌های تکراری موجود در بحث یکپارچه شد.

۷- لطفا یافته های خود را با مقاله ای با عنوان " Transcriptional Profiling of Hippocampus Identifies Network Alterations in Alzheimer's Disease " که از دسته داده های انتخابی شما استفاده کرده و مطالعه کامل تری است، مقایسه کنید. آیا در مطالعه شما یافته جدیدی نسبت به مقاله یاد شده بدست آمده است؟

مقاله مورد نظر که در اردیبهشت ماه منتشر شده است همانگونه که داور گرامی نیز به آن اشاره داشته‌اند روش شناسی و داده‌های جامع تری مورد استفاده قرار داده است. نتایج مقاله مورد اشاره تا حد زیاد تایید کننده نتایج مطالعه حاضر می‌باشد و به عنوان رفرنس جدید (رفرنس ۵۲) در بحث مورد استفاده قرار گرفت. به عنوان مثال از ۴ ژن کلیدی معرفی شده سه ژن *SNAP25*، *AMPH* و *SYN2* در هر دو مقاله به عنوان ژن‌های کلیدی معرفی شده‌اند. همچنین مسیرهای "neurotransmitter secretion" و "calcium-ion regulated exocytosis" در هر دو مطالعه جزو مسیرهای تاثیر گزار می‌باشند. شاید نقطه ضعف مقاله مورد اشاره استفاده غیر موجه از دو مسیر متفاوت برای ساخت شبکه‌های میانکنش ژنی می‌باشد (WGCNA و STRING) می‌باشد که چندین ژن کلیدی نیز از هر مسیر معرفی نموده است که شباهتی به یک دیگر نیز ندارند. در مطالعه حاضر ژن UNC13A به عنوان ژن کلیدی معرفی شده که در مقاله مورد بحث اشاره نشده است. همانگونه که در بحث اشاره شده نقش این پروتئین در آلزایمر مورد تایید قرار گرفته است و از طرفی پروتئین UNC13A به پروتئین SNAP25 دارای اتصال مستقیم و فیزیکی می‌باشد و در تشکیل کمپلکس SNARE نقش بسیار مهمی دارد. بنابراین مجموعه ۴ تایی ژن‌های کلیدی معرفی شده دارای consistency بوده و می‌تواند به عنوان یک پنل واحد تشخیصی و درمانی بالقوه مورد توجه تحقیقات آزمایشگاهی قرار بگیرند.

همچنین لازم به ذکر است که جدول شماره ۳ که حاوی فقط یک زن بود از مقاله حذف شد و اطلاعات مربوطه در متن (صفحه۹ سطر ۴) آورده شد.

شناسایی ژن‌ها و فرایندهای کلیدی آلزایمر با تحلیل مبتنی بر شبکه‌ی ترنسکریپتوم هیپوکامپ

Exploring signature genes and pathways in Alzheimer's disease by network based analysis of Hippocampus transcriptome data

شناسایی ژن‌ها و فرایندهای کلیدی آلزایمر با تحلیل مبتنی بر شبکه‌ی ترنسکریپتوم هیپوکامپ

چکیده

زمینه و هدف: بیماری آلزایمر، شایع‌ترین بیماری زوال عصبی می‌باشد و اختلال در حافظه، بارزترین ویژگی آن است. ناحیه هیپوکامپ مغز، اولین ناحیه‌ای است که در آلزایمر دچار تغییرات می‌شود. **ابزار**های زیست‌شناسی سامانه‌ها از جمله تکنیک‌های توان بالا ما را قادر می‌سازند تا ژن‌های برجسته‌ی دخیل در آغاز و پیشرفت بیماری را جستجو کنیم که می‌توانند بعنوان نامزدهای جدید تشخیصی و درمانی بیماری‌های پیچیده مانند آلزایمر درنظر گرفته شوند.

روش بررسی: در مجموع ۸۵ نمونه‌ی بدست‌آمده از ناحیه هیپوکامپ مغز افراد سالم و مبتلا به آلزایمر از دو مجموعه داده انتخاب شد. آنالیز تفاوت بیان بصورت جداگانه برای هر دو مجموعه داده انجام و نتایج بدست‌آمده با یکدیگر ادغام شد. ژن‌هایی که بطور مشترک در دو مجموعه داده الگوی بیانی یکسان داشتند، جهت ساخت یک شبکه ژنی با استفاده از پایگاه داده STRING، مورد استفاده قرار گرفتند. آنالیز شبکه بدست‌آمده، به‌منظور یافتن ژن‌های کلیدی دخیل در بیماری انجام گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه، ۷۳ ژن دارای الگوی بیانی یکسان در دو مجموعه داده یافت شد. با آنالیز شبکه بدست‌آمده، ٤ ژن *SNAP25*، *UNC13A*، *SYN2* و *AMPH* بعنوان ژن‌های کلیدی دخیل در آلزایمر گزارش شد.

نتیجه‌گیری: نقش ژن‌های گزارش‌شده در فرآیندهای اندوسیتوز، رهاسازی انتقال‌دهنده‌های عصبی و چرخه‌ی وزیکول سیناپسی، کارکرد صحیح حافظه را میسر می‌سازد و تغییرات بیانی و جهش در هرکدام از این ژن‌ها، مسیرهای دیگر را تحت تاثیر قرار داده و موجب بروز آلزایمر می‌گردد. بنابراین ژن‌های کلیدی معرفی‌شده در این مطالعه، می‌توانند بعنوان مارکرهای بالقوه جهت توسعه‌ی روش‌های تشخیصی و درمانی آلزایمر مورد توجه قرار گیرند.

کلیدواژه‌ها: آلزایمر، تکنیک‌های توان بالا، پروفایل بیان ژن، شبکه ژنی، آنالیز ترنسکریپتوم

Exploring signature genes and pathways in Alzheimer's disease by network based analysis of Hippocampus transcriptome data

Abstract

Background and Objectives: Alzheimer's disease is the most common neurodegenerative disease and the memory impairment is the main prominent symptom of this disease. The hippocampus of the brain, is the first region that undergoes changes in Alzheimer's. Systems biology tools such as high-throughput techniques, enable us to explore signature genes involved in disease initiation and advancement which can be considered as new therapeutic and diagnostic candidates in complex diseases like Alzheimer's.

Methods: A total of 85 samples obtained from the hippocampus of the brain of healthy individuals and individuals with Alzheimer's were selected from two datasets. Differential expression analysis was performed independently for both datasets and the results were integrated. Genes with the same expression pattern in the two datasets were used to construct a gene-gene network using the STRING database. The obtained network analysis was performed to detect key genes associated with the disease.

Results: In this study, 73 genes with the same expression pattern were found in the two datasets. The obtained network analysis led to the identification of *SNAP25*, *UNC13A*, *SYN2* and *AMPH* as key genes connected with Alzheimer's disease.

Conclusion: The role of the reported key genes in endocytosis, neurotransmitters release and synaptic vesicle cycle facilitate proper functioning of memory. Expressional changes and mutations in each of these genes effect other pathways and lead to Alzheimer's. Thus, the key genes reported in this study, can be considered as potential markers in developing diagnostic and therapeutic methods for Alzheimer's.

Keywords: Alzheimer's disease; High-throughput techniques; Gene expression profile; Gene-gene network; Transcriptome analysis

مقدمه

بیماری آلزایمر[1] شایع‌ترین بیماری زوال عصبی می‌باشد بطوریکه ۶۰ تا ۷۰ درصد علل زوال عصبی[2] را شامل می‌شود. پیامدهای آلزایمر بر افراد و جامعه موجب افزایش نگرانی‌ها در رابطه با این بیماری شده‌است. تحقیقات انجام‌شده اخیر در آمریکا نشان می‌دهد در حال حاضر ۵٫۸ میلیون فرد بالای ۶۵ سال آلزایمر دارند و این عدد تا نیمه قرن ۲۱ به ۱۳٫۸ میلیون خواهد رسید. در سال ۲۰۱۸ تعداد مرگ ثبت‌شده در اثر آلزایمر حدود ۱۲۲هزار نفر ثبت شده که نشان می‌دهد آلزایمر ششمین عامل مرگ در آمریکا می‌باشد. با بالا رفتن میانگین سن جمعیت‌ها، تخمین زده می‌شود شمار افراد مبتلا به آلزایمر در سال ۲۰۴۰ به بیش از ۸۱ میلیون نفر خواهد رسید[۱].

در آلزایمر تعداد و ارتباطات نورون‌های ناحیه هیپوکامپ و قشر مغز کاهش می‌یابد و به تدریج سایر نواحی مغز را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد. هیپوکامپ اولین ناحیه‌ای می‌باشد که دچار تغییرات می‌شود[۲]. مطالعات انجام‌شده در سال‌های اخیر موجب پیشرفت زیادی در شناسایی علل این بیماری و روش‌های تشخیصی و درمانی شده‌است. تمامی روش‌های درمانی حال حاضر موجود برای آلزایمر تنها در میزان بروز علائم این بیماری موثر می‌باشند. اگرچه مطالعات صورت گرفته در تشخیص روش‌های پیشگیری و کاهش روند پیشرفت این بیماری بسیار موثر بوده اما هم‌چنان راهکار درمانی کاملی ارائه نشده‌است. آلزایمر تنها به زوال اعصاب محدود نمی‌شود و به میزان بسیار زیادی با مکانیسم‌های ایمونولوژیکی در مغز مرتبط است. برای مثال پروتئین‌های انباشته‌شده و با تاب‌خوردگی اشتباه به گیرنده‌های شناسایی موجود در سطح میکروگلیاها و آستروگلیاها می‌چسبند و موجب بروز پاسخ ایمنی و ترشح واسطه‌های التهابی می‌شوند که درنهایت منجر به پیشرفت بیماری می‌گردد[۳].

درمراحل مختلف آلزایمر تغییرات ژنتیکی متفاوتی رخ می‌دهد. در مراحل اولیه، جهش‌هایی در ژن‌های کدکننده‌ی پروتئین پیش‌ساز آمیلوییدAPP) و PSEN1 و PSEN2 رخ می‌دهد. در مراحل پایانی آلزایمر فاکتورهای متفاوت ژنتیکی دخیل‌اند که مهمترین آنها الل $\varepsilon 4$ ژن *APOE* می‌باشد[۴]. یکی از شاخصه‌های اصلی آلزایمر تشکیل تجمعات پپتیدهای بتاآمیلوییدی می‌باشد که در این فرایند ژن‌های *Sod1, Cat, mt-Nd1, Bcl2, Sirt5, Sod2* و *Sdha* دخالت دارند[۵]. در یکی از تحقیقات صورت‌گرفته در رابطه با آلزایمر، چهار ژن *CCK, TAC1, CALB1* و *CNR1* بعنوان ژن‌های دارای تغییر بیان در ناحیه هیپوکامپ معرفی شده‌اند[۶]. شاخصه مهم دیگر آلزایمر، تشکیل گره‌های نوروفیبریلاری(NFT) است که در اثر انباشت پروتئین‌های tau هایپرفسفریله‌شده ایجاد می‌شوند. بررسی‌های انجام‌شده در رابطه با اتوفاژی که عامل مساعد برای تشکیل این تجمعات می‌باشد، نشان داده‌است که مسیر PI3K-AKT-mTOR بعنوان مسیری کلیدی و ژن‌های *ATG7, BCL2, BECN1, CDK5, CLU, CTSD, FOXO1, GFAP, ITPR1, MAPT, PSEN1, SNCA, UBQLN1* و *UCHL1* در آلزایمر نقش ایفا می‌کنند[۷][۸].

تکنیک‌های توان بالا[3] مانند microarray و RNA-Seq این امکان را فراهم کرده‌اند که با بررسی پروفایل بیان ژن بتوان تغییرات بیانی تمامی ژن‌های یک ارگانیسم را بصورت همزمان ارزیابی کرد. این ابزارها این امکان را فراهم ساخته‌است تا با بررسی ژن‌ها و

[1] Alzheimer
[2] Neurodegeneration
[3] High-throughput

بیانشان و مسیرهای درگیر در یک بیماری یا فنوتیپ خاص، روش‌های درمانی و تشخیصی مناسبی را شناسایی کرد. برای مدل‌سازی سیستم‌های پیچیده‌ای همانند سیستم‌های زیستی با استفاده از چنین داده‌هایی می‌توان از روش‌های مبتنی بر شبکه استفاده کرد. شبکه‌های ژنی را می‌توان با استفاده از روش‌های مختلف و با تکیه بر داده‌های بیانی به دست آورد. این شبکه ها، با ارائه‌ی ژن‌ها و روابط تنظیمی‌شان اطلاعات بسیار جامع و پرکاربردی را در اختیار محققین قرار می‌دهد. تاکنون مطالعات متعددی درخصوص آلزایمر با تکیه بر تکنیک‌های توان بالا و با تمرکز بر ناحیه هیپوکامپ مغز انجام شده‌است. از این دست مطالعات می‌توان به مطالعه ترنسکریپتومی برروی ناحیه هیپوکامپ مغز با استفاده از تکنیک RNA-Seq اشاره کرد که در نتیجه‌ی آن *TAC1* و *SERPINE1* بعنوان ژن‌های کلیدی و اختلال در ارتباطات میان نورون‌ها، عروق مغزی و پاکسازی تجمعات بتاآمیلوئیدی بعنوان فرایندهای دخیل در آلزایمر گزارش شدند[۹]. در مطالعه دیگری با همین رویکرد *BIN1*، *PICALM*، *APP* و *CELF1* بعنوان ژن‌های کلیدی در آلزایمر با تمرکز بر ناحیه هیپوکامپ معرفی شدند که در مسیرهای مشخصه‌ی آلزایمر مانند مسیر پیام‌رسانی انتقال‌دهنده‌های عصبی، انتقال سیناپسی و تخریب نورونی حضور دارند[۱۰]. از دیگر مطالعات ترنسکریپتومی صورت‌گرفته بر آلزایمر با تمرکز بر هیپوکامپ می‌توان به مطالعه‌ای اشاره کرد که در آن *SERPINA5*، *RYBP*، *SLC38A2*، *FEM1B* و *PYDC1* بعنوان ژن‌های کلیدی معرفی شدند و بیان شده‌است که تغییرات بیانی این ژن‌ها در مسیرهای تشکیل گره‌های عصبی–فیبریلاری و از بین رفتن سلول‌های عصبی نقش دارند[۱۱]. هم‌چنین در مطالعه‌ی دیگری *ACTB*، *HDGF* و *WDR82* بعنوان محوری‌ترین ژن‌های ناحیه هیپوکامپ در فرآیند آلزایمر معرفی شدند که نقش تغییرات بیانی آنها در تخریب سیناپسی و پیشرفت آلزایمر گزارش شده‌است[۱۲].

بنابراین مطالعات ترنسکریپتومی با در اختیار گذاشتن پروفایل بیان ژنی و بررسی تغییرات بیان ژن‌ها در ناحیه هیپوکامپ، در شناخت ما نسبت به ژن‌های دخیل در آلزایمر و شناسایی مسیرهای منجر به این بیماری کمک شایانی کرده‌است. هم‌چنین به‌دلیل پیچیدگی بیماری آلزایمر و نیز گستردگی ژنوم موجودات، این قبیل مطالعات و اطلاعات استخراج‌شده از آن‌ها، از اهمیت بسیار بالایی برخوردار می‌باشند.

به همین منظوردر مطالعه حاضر، مقادیر بیان ژنی ناحیه هیپوکامپ مغز بیماران آلزایمری با افراد سالم با استفاده از تحلیل مبتنی بر شبکه داده های ترنسکریپتوم مورد بررسی قرار گرفته‌است. بر همین اساس دو دیتاست حاوی پروفایل بیان ژنی، مربوط به بیماری آلزایمر از پایگاه داده GEO استفاده شد. با استفاده از داده‌های این دیتاست‌ها، ژن‌ها و مسیرهای ژنی دخیل در آلزایمر و بطور خاص ناحیه هیپوکامپ مغز شناسایی شدند. سپس به منظور شناسایی ژن‌های کلیدی، شبکه ژنی برای این ژن‌ها با استفاده از پایگاه داده STRING رسم شد. ژن‌های کلیدی معرفی‌شده در نتیجه‌ی آنالیز شبکه، به جهت داشتن نقش محوری در سازوکارهای درون سلولی، می‌توانند در ارائه و توسعه‌ی روش‌های تشخیصی و درمانی آلزایمر مورد توجه قرار گیرند.

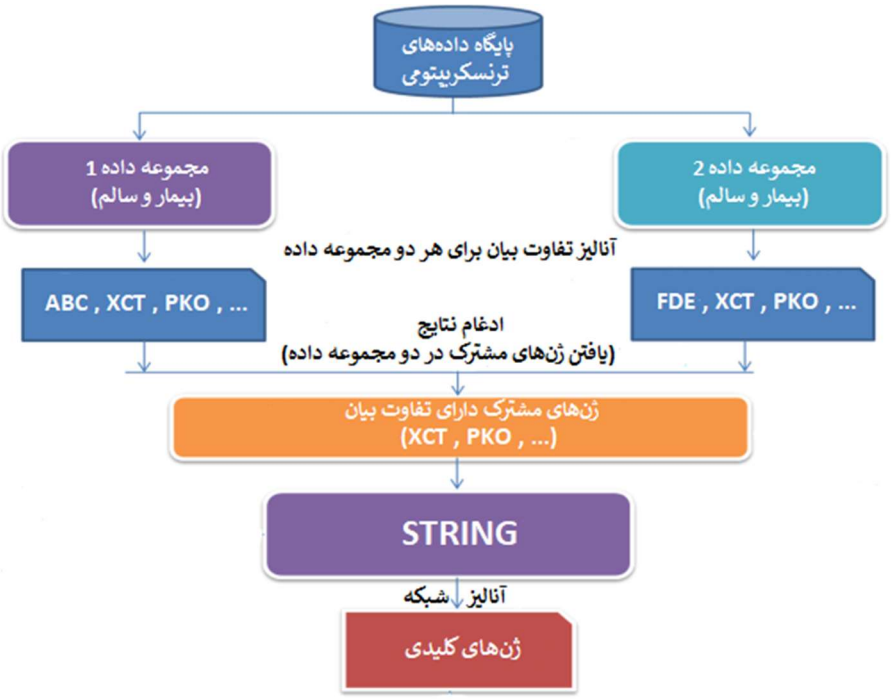
روش‌ها

در این مطالعه از دو دیتاست با کدهای دسترسی GSE5281 و GSE48350 مربوط به بیماری آلزایمر از پایگاه داده GEO استفاده شد. این داده‌ها دارای نمونه‌های مربوط به افراد بیمار و سالم می‌باشند. پلتفرم مورد استفاده در این داده‌ها Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array می‌باشد.

از مجموعه داده GSE5281، مجموعا ۲۳ نمونه مورد استفاده قرار گرفت که از این تعداد ۱۰ نمونه مربوط به پروفایل بیانی ناحیه هیپوکامپ مغز افراد مبتلا به آلزایمر و ۱۳ نمونه مربوط به افراد سالم بودند و از مجموعه داده GSE48350، ٦٢ نمونه مورد استفاده قرار گرفت که ۱۹ نمونه مربوط به پروفایل بیانی ناحیه هیپوکامپ مغز افراد مبتلا به آلزایمر و ٤٣ نمونه سالم بودند[۱۳-۲۲]. درکل ۸۵ نمونه در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت.

پیش‌پردازش و نرمالیزاسیون داده‌ها با استفاده از روش RMA در پکیج Oligo در محیط R انجام شد[۲۳].

برای شناسایی ژن‌های دارای تفاوت بیان از پکیج limma در محیط R استفاده شد. به این منظور از آزمون آماری t-test استفاده شد و از p-value برابر ۰/۰۵ و قدر مطلق LFC (Log2 Fold Change) برابر ۱ برای شناسایی ژن‌هایی که دارای تفاوت بیان هستند استفاده شد. هم‌چنین از روش BH نیز به منظور افزایش صحت در تحلیل t-test استفاده شد. نمودار volcano به منظور نمایش ژن‌های دارای تفاوت بیان در هر مجموعه داده با توجه به حد آستانه‌های تعریف شده برای LFC و p-value رسم شد. در مرحله بعدی ژن‌هایی که به طور مشترک در هر دو مجموعه داده دارای تفاوت بیان بودند انتخاب شدند و وارد مراحل بعدی تحلیل و ارزیابی شدند. به منظور مشاهده الگوی بیانی ژن‌های مشترک دارای تفاوت بیان میان دو گروه نمونه‌ای نمودار heatmap نیز رسم شد.(شکل ۱)[٢٤]



شکل ۱. روش شناسی تحلیل داده‌های ترنسکریپتومی

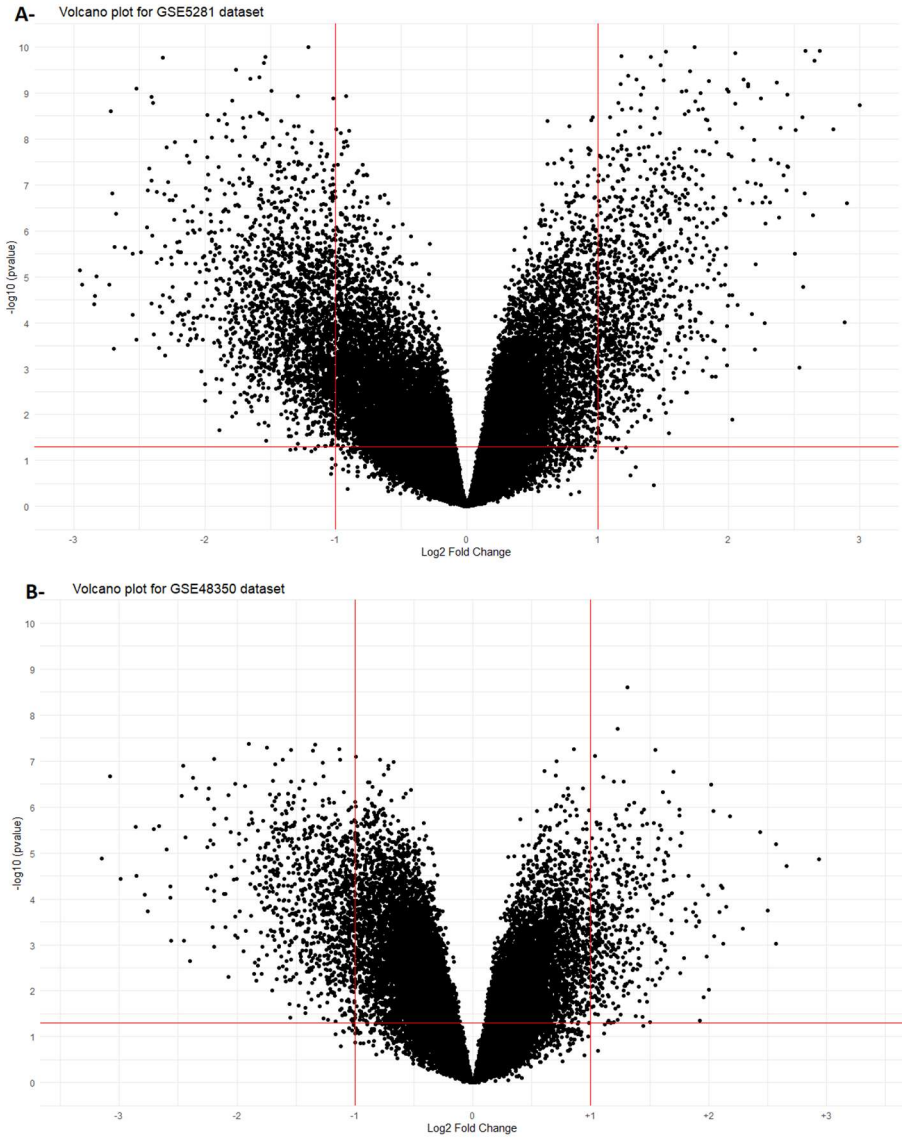
به منظور تحلیل لیست ژن به‌دست‌آمده از مرحله قبل و شناسایی مسیرهای بیولوژیکی که این ژن‌ها در آن درگیر هستند، تحلیل Functional annotation با استفاده از وب سرور DAVID انجام شد(رفرنس DAVID). برای این منظور از پایگاه‌های داده GO و KEGG استفاده شد و از آزمون آماری Hypergeometry با سطح معنی داری p-value کوچکتر از ۰,۰۵ برای شناسایی مسیرهای بیولوژیکی مورد استفاده قرار گرفت [۲۵–۲۸].

به منظور ساخت شبکه‌های ژنی دخیل در فنوتیپ مورد بررسی، ژن‌های دارای تفاوت بیان به‌دست‌آمده در مرحله پیش وارد پایگاه داده STRING شدند. این پایگاه داده حاوی اطلاعات گسترده مبتنی بر نتایج آزمایشگاهی و تئوری و پیش بینی درباره میانکنش بین پروتئین‌ها/ژن‌ها می‌باشد که به شکل گسترده‌ای برای ساخت شبکه‌های ژنی و شبکه‌های میانکنش پروتئینی مورد استفاده قرار می‌گیرد. پس از ساخت شبکه‌ها که تصویری از سطح ترنسکریپتومی فعال در ناحیه هیپوکامپ مغز بیماران مبتلا به آلزایمر را نشان می‌دهد، این شبکه با استفاده از پارامترهای مرکزی شبکه مورد ارزیابی قرار گرفت[۲۹–۳۱]. به منظور آنالیز شبکه بدست‌آمده و تجزیه تحلیل آن، از نرم‌افزار Cytoscape استفاده شد[۳۲]. این نرم‌افزار امکان تحلیل شبکه و جمع آوری پارامترهای شبکه را با استفاده از ماژول Network Analyzer فراهم می‌کند. در این مطالعه از دو پارامتر مرکزی شبکه شامل: درجه(DG)[4] و مرکزیت بینابینی(BC)[5] برای هر کدام از گره‌های شبکه (که متناظر ژن‌ها در شبکه می‌باشند) استفاده شد. درجه، تعداد اتصالات یک ژن با سایر ژن‌ها در شبکه را نشان می‌دهد.مرکزیت بینابینی نیز، نشان‌دهنده این است که یک ژن چه میزان موجب اتصال دو بخش مختلف شبکه که بهم ارتباط ندارند، می‌شود. در واقع پتانسیل یک گره در شبکه برای ایفای نقش پل را نشان می‌دهد. اینکه ژن‌هایی به لحاظ این دو پارامتر در شبکه ارزش بالایی داشته باشند، نشان دهنده اهمیت بالای تنظیم کنندگی آن ژن‌ها در شبکه می‌باشد که سطح ترنسکریپتوم فعال شبکه در ناحیه هیپوکامپ بیماران آلزایمری را نشان می‌دهد بطوریکه احتمالا آن ژن شروع کننده‌ی یک آبشار و مسیر رویدادهای مبتنی بر ژن است که نقش برجسته ای در شروع و ادامه بیماری دارد. در نرم‌افزار Cytoscape با استفاده از ماژول Network Analyzer، دو پارامتر نام‌برده‌شده برای هر گره(ژن) استخراج شد. سپس با بررسی این مقادیر برای تمام گره‌ها، سه مقدار ژنی که در هر کدام از پارامترها مقدار بیشینه داشتند به عنوان ژن‌های کلیدی در این مطالعه معرفی شدند.[۳۳][۳۴].

نتایج

آنالیز تفاوت بیان برای هر دیتاست با آزمون t-test انجام شد. درنتیجه تعداد ژن‌های دارای تفاوت بیان برای هر دیتاست گزارش شدند. شکل۲ نمودار volcano را برای دو مجموعه داده مورد استفاده در مطالعه نشان می‌دهد. این نمودار نشان دهنده مقادیر LFC در برابر –log10(p-value) برای تمام ژن‌ها در مجموعه داده مورد بررسی می‌باشد. خطوط افقی و عمودی رسم شده در نمودار نشان دهنده حد آستانه‌های مورد استفاده برای LFC و p-value می‌باشد که پیشتر به آن اشاره شده است. نقاط موجود در گوشه بالا سمت راست هر نمودار نشان دهنده ژن‌های دارای افزایش بیان و مجموعه نقاط موجود در گوشه بالا سمت چپ نشان دهنده ژن‌های دارای کاهش بیان می‌باشد. تعداد ژن‌های مشترک دارای تفاوت بیان و هم‌چنین تعداد ژن‌های دارای تفاوت بیان هر دیتاست در جدول ۱ قابل مشاهده است. در ادامه ژن‌هایی که بطور مشترک در هردو دیتاست تفاوت بیان داشتند انتخاب شدند تا برای مطالعات بیشتر مورد بررسی قرار گیرند.

[4] Degree
[5] Betweenness centrality

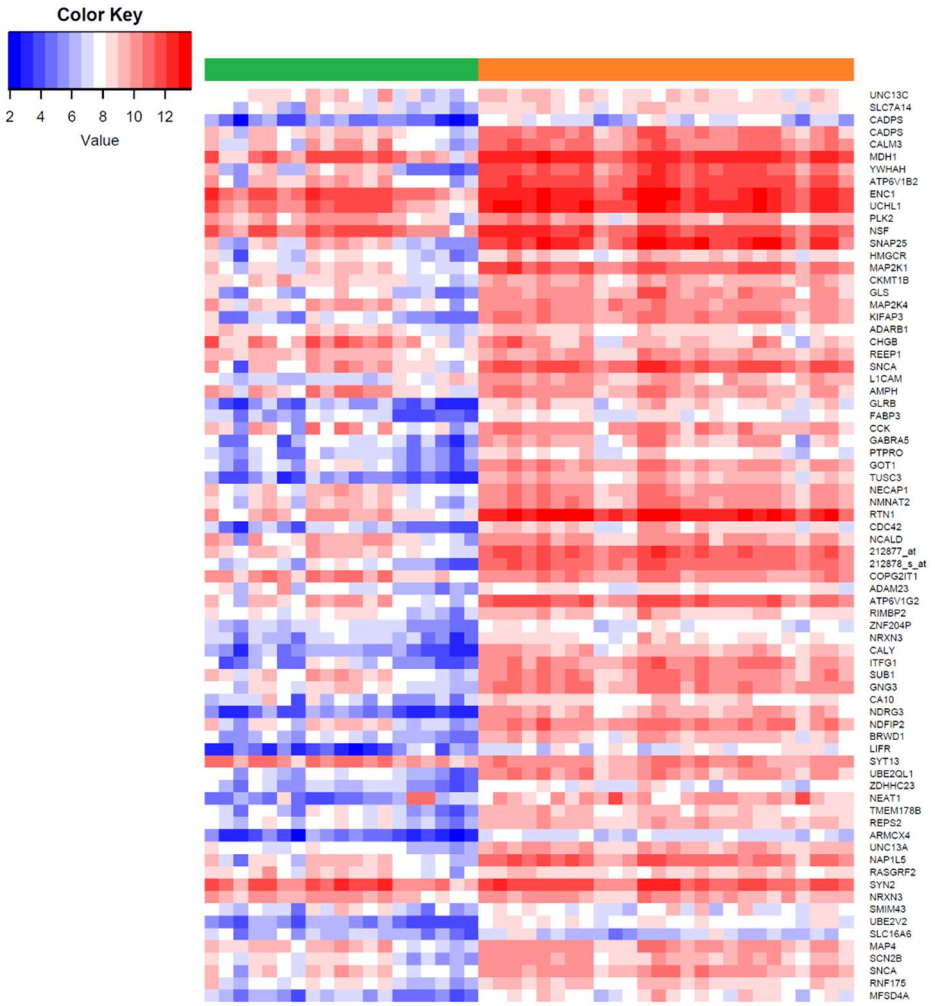


شکل۲- نمودار volcano برای مجموعه داده GSE5281 (شکل A) و مجموعه داده GSE48350 (شکل B). محور افقی مقدار LFC و محور عمودی مقدار (log10(p-value– برای هر ژن را در مجموعه داده مورد بررسی نشان می‌دهد. خط افقی قرمز نشان دهنده حد آستانه تعیین شده برای p-value می‌باشد که برابر 0.05 می‌باشد که وقتی در مقیاس log10– قرار می-گیرد معادل 1.3 می‌شود. خط عمودی قرمز نیز نشان‌دهنده حد آستانه انتخاب شده برای LFC است که قدر مطلق ۱: شامل +۱ و -۱ می‌باشد.

جدول ۱: تعداد ژن‌ها باافزایش و کاهش بیان، براساس فیلترهای اعمال‌شده

	تعداد ژن‌ها با افزایش بیان	تعداد ژن‌ها با کاهش بیان	تعداد کل ژن‌ها
GSE5281	۳٤۸	٦۷۱	۱۰۱۹
GSE48350	۲٦۲	٦٦۲	۹۲٤
بررسی کلی در دو دیتاست	۲	۷۱	۷٤

از ۷٤ ژنی که در هر دو مجموعه داده تفاوت بیان داشتند، ۷۱ ژن در هر دو کاهش بیان، ۲ ژن در هر دو افزایش بیان و تنها یک ژن (L1CAM) بیانش در دو دیتاست متفاوت بود؛ بطوریکه در GSE5281، افزایش بیان و در GSE48350، کاهش بیان داشت (شکل۳). ژن‌های مشترک دارای تفاوت بیان که برای انجام بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند و هم‌چنین چگونگی تغییر بیانشان در هر مجموعه داده در جدول ۲ قابل مشاهده می‌باشد.



شکل۳. نمودار heatmap برای ژن‌های مشترک شناسایی شده در دو مجموعه داده مورد بررسی. الگوی بیانی ژن‌های مشترک دارای تفاوت بیان در دو مجموعه داده. سطرها نشان دهنده ژن‌ها و ستون‌ها نمونه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهند(رنگ سبز بیماران آلزایمری و رنگ نارنجی نمونه‌های سالم). رنگ قرمز نشان دهنده افزایش بیان و رنگ آبی نشان دهنده کاهش بیان می‌باشد که چگالی رنگی متناسب با میزان افزایش و کاهش بیان است که در Color Key نمودار نشان داده شده است.

جدول ۲: ۷۳ ژن با تغییرات بیان ژنی مشترک در دو دیتاست مورد مطالعه برای آلزایمر

نحوه تغییر بیان ژن	ژن‌ها	GSE5281	GSE48350
کاهش بیان	NSF	-۱.٦۹۳۲۲	-۱.۰٤٦۷۱
	ATP6V1G2	-۱.٥۹۲٥۲	-۰.۹٦٤۳٥
	CHGB	-۲.۲٥۷۰٥	-۱.٥٦۰۲٤
	REPS2	-۱.٦٤۰۲۰	-۰.٦۹۹۲۰
	BRWD1	-۱.۷٤۸۰٥	-۰.۷۷٥۱٥
	NDRG3	-۱.۸۳٦٥۲	-۰.۷۰۳۳۷
	UCHL1	-۲.۱۹٦۰۸	-۰.۹٤۷۸٥
	YWHAH	-۳.٥۱۷۸٤	-۱.۰۲۰٦۰
	ADARB1	-۱.۷۳۷٤۲	-۰.٦۷۰۱۰
	GABRA5	-۱.٦٦۷۳٤	-۱.۰۹٥۸٦
	NECAP1	-۱.٥٦۱۱۱	-۰.۸۲٤٤۲
	PTPRO	-۱.٥۰۸٦٦	-۰.۸۸۰۱٤
	GOT1	-۲.۲٦۸۲۹	-۰.۹۱۸٦۹
	AMPH	-۲.۱۸۸٤٥	-۱.۱۲۹۸۹
	KLC1	-۱.٦۰٥۷۰	-۰.۸٥٥۰۳
	KNS2	-۲.٦۷٥۹۳	-۰.٦۸۳۳۹
	TUSC3	-۱.٤۳۸٦۹	-۰.٦۸۳۰۸
	RNF175	-۱.۸۱٤۱۱	-۰.۷٦۳۱۳
	NAP1L5	-۱.۸۷۳۳۱	-۱.۱٤۱٥٦
	GLRB	-۱.۷٥۸٥۳	-۰.۹۲۰۲۹
	ATP6V1B2	-۲.۰۸۰٤۷	-۰.۷۷٦٤۰
	UBE2V2	-۱.٦٦۱۲۲	-۰.۷۱٤٥۰
	SUB1	-۱.۸۱۰۸٥	-۰.۷٥٤۱٦
	ITFG1	-۲.۲۰۲٦٤	-۰.٦۷۰۰٥
	NRXN3	-۱.۷۸٥۱٤	-۰.۸٥٦۲۸
	NRXN3	-۱.٥٦٤۲۸	-۰.۹٦۷۷۲

١	SNCA	-١.٥٦٤٢٥	-٠.٧١٤٩٩	
٢	SNCA	-١.٧٩٢٩٠	-٠.٦٧٠٥٥	
٣	COPG2IT1	-١.٨٤٠٩١	-٠.٩٤٠٧٦	
٤	SNAP25	-٢.٨٤٦٣٣	-١.٣٥١٠٢	
٥	CA10	-١.٦٢٠٥٠	-٠.٨٨٤١٩	
٦	RASGRF2	-١.٦٩٣٧٨	-٠.٨٣٨٠٢	
٧	SYN2	-١.٨١٩٥٩	-١.٢٥٥٤٣	
٨	CCK	-١.٧٦٣١٠	-١.٠٠٩١٧	
٩	CKMT1B	-١.٧٠٧٣٤	-١.٠٠١٤٥	
١٠	NDFIP2	-١.٨٩٩٤٧	-٠.٦٩٠٦٦	
١١	ARMCX4	-١.٥٠١٨٢	-٠.٧٦٤٢١	
١٢	NCALD	-١.٨٧٨٨٠	-١.١٢١٤٣	
١٣	CADPS	-١.٦٤٤٥٩	-١.٣٥٣٢٧	
١٤	CADPS	-١.٥٨٣٨٥	-١.٧١٥٠٩	
١٥	FABP3	-٢.٤٢٤٦١	-٠.٧٦٤٠٩	
١٦	RTN1	-١.٤٧٠٨٧	-٠.٦٩٤٥٨	
١٧	ADAM23	-٢.٢١١٢٢	-٠.٩١٥٩٨	
١٨	CALY	-١.٩٢٤٧٠	-١.٠٦٨٦٨	
١٩	CALM3	-٢.١٠٧٩٣	-٠.٧١٥٣٣	
٢٠	SMIM43	-١.٦٦١٣٧	-١.٤٢٦٠١	
٢١	SCN2B	-٢.٢٣٠٣٥	-٠.٩٩٦٠٩	
٢٢	SLC7A14	-١.٧٢٣٥٠	-٠.٩١٢٥٨	
٢٣	MAP2K4	-١.٦٦٦٠٥	-٠.٧٠٩٥٤	
٢٤	GNG3	-١.٤٩٨٦٥	-٠.٩٩٦٣٠	
٢٥	UBE2QL1	-١.٧٨٣٢٥	-٠.٩٧٩٧٧	
٢٦	GLS	-١.٧٨٨١١	-١.٠٥٣٣٨	
٢٧	UNC13C	-١.٧٠٢١٧	-٠.٦٩٩٣١	
٢٨	KIFAP3	-٢.٠١٦٦٤	-٠.٧٢٦٩٠	
٢٩	MAP2K1	-١.٤٣١٧٤	-٠.٧٤٦٣١	
٣٠	TMEM178B	-٢.١٧١٢٠	-٠.٨٣٥١٩	
	MFSD4A	-١.٦٨٧٩٦	-١.٠١٣٦٢	
	NMNAT2	-٢.٠٠٩٢٧	-١.٠٩٨٢٩	
	SYT13	-١.٥٢٣٨١	-١.١٤١٠٥	
	MDH1	-١.٧٥٦٢١	-٠.٧٩٩٦٨	
	HMGCR	-١.٨٥٧٠٦	-٠.٦٨٤٨٢	

	ZNF204P	-۱.۹۳۷٦۹	-۰.۷٤۲۲۲
	ENC1	-۱.۹۳٥٥٤	-۰.۸٦٤۷۲
	PLK2	-۱.۸٤٦٤۰	-۰.۹٦۷۲٥
	RIMBP2	-۱.٥۷۲۷٥	-۰.۹٦۲٥۷
	MAP4	-۲.۲۹۱۹٥	-۱.۳۱۷٦٤
	ZDHHC23	-۱.٦۰٥۸۳	-۰.۷۲۷۲٤
	SLC16A6	-۱.٤۸۹٦۰	-۰.۸۹۳٥٥
	UNC13A	-۱.٤٤٦٥۲	-۰.۷۲۹۳٥
	REEP1	-۱.٤۳۸۸۸	-۰.۷٤۹۳۰
	CDC42	-۱.۸۹۰۳۸	-۱.٤۸۱۹۷
افزایش بیان	LIFR	۱.۹٦۳۰۹	۰.۷۰۸۹۹
	NEAT1	۲.٥۳۸٦۷	۰.۸۰۹۱۹

تفسیر ژن‌های مشترک شناسایی‌شده در ناحیه هیپوکامپ برای آلزایمر

به منظور تجزیه تحلیل ژن‌های بدست‌آمده، ژن‌ها وارد نرم افزار برخط DAVID شدند. با استفاده از پایگاه‌های داده GO و KEGG و با تکیه بر تست هایپرژئومتری و با درنظر گرفتن مقادیر کوچکتر از ۰,۰۵ برای p-value، مسیرهای دخیل در آلزایمر شناسایی و گزارش شدند. در اطلاعات بدست‌آمده از این پایگاه‌های داده، مسیرهای معرفی‌شده و دخیل در آلزایمر مانند "synaptic vesicle cycle" ، "neurotransmitter secretion" و "calcium-ion regulated exocytosis" به چشم می‌خورد. جزئیات بیشتر در جدول‌های ۳ و ٤ قابل مشاهده است.

جدول ۳: مسیرهای بیولوژیکی شناسایی‌شده توسط GO و براساس ژن‌های مشترک شناسایی‌شده برای آلزایمر

عنوان مسیر	تعداد	p-value	ژن‌ها
GO:0007268~Chemical synaptic transmission	۱۳	۲.۳٥E-۰٥	SNAP25, UNC13C, RIMBP2, GLRB,SCN2B,GLS,GABRA5,SNCA,AMPH, ADARB1,CADPS,UNC13A,SYN2
GO:0099003~Vesicle-mediated transport in synapse	۸	٦.۱۳E-۰٥	CALY,SNAP25,UNC13C,SNCA,AMPH,CADPS, UNC13A,SYN2
GO:0099504~Synaptic vesicle cycle	۷	۰.۰۰۰٦	SNAP25,UNC13C,SNCA,AMPH,CADPS,UNC13A,SYN2
GO:0007154~Cell communication	۱٤	۰.۰۰۱۲	YWHAH,CALY,SNAP25,UNC13C,RIMBP2, LIFR, GLRB,SUB1,CCK,CDC42,MAP2K4,UNC13A, NRXN3,SYN2
GO:0016082~Synaptic vesicle priming	٤	۰.۰۰۱۲	SNAP25,UNC13C,SNCA,UNC13A
GO:0017156~Calcium-ion regulated exocytosis	٥	۰.۰۰۱۲	SYT13,UNC13C,CADPS,UNC13A,SYN2

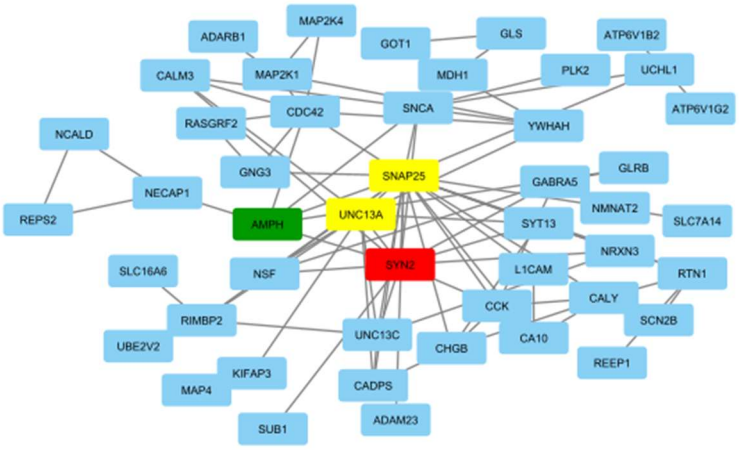
GO:0023052~Signaling	١٣	٠.٠٠١٧	YWHAH,CALY,SNAP25,UNC13C,RIMBP2, RASGRF2,NCALD,CCK,CDC42,MAP2K4,U NC13, NRXN3,SYN2
GO:0051234~Establishment of localization	٧	٠.٠٠١٧	SNAP25,UNC13C,GLRB,ATP6V1B2,SCN2B , UCHL1,CALM3
GO:0007269~Neurotransmitter secretion	٦	٠.٠٠٢٢	SNAP25,UNC13C,SNCA,CADPS,UNC13A,S YN2
GO:0051179~Localization	١٢	٠.٠٠٢٢	SYT13,SLC7A14,YWHAH,CALY,SNAP25, UNC13C,GLRB,ATP6V1B2,SCN2B,PTPRO, UCHL1,CALM3
GO:0016079~Synaptic vesicle exocytosis	٥	٠.٠٠٣٣	SNAP25,UNC13C,SNCA,CADPS,UNC13A
GO:0007267~Cell-cell signaling	١١	٠.٠٠٤٥	SNAP25,UNC13C,RIMBP2,GLRB,SCN2B,C ALM3,GLS,GABRA5,SNCA,AMPH,SYN2
GO:1990504~Dense core granule exocytosis	٣	٠.٠٠٤٥	UNC13C,CADPS,UNC13A
GO:0006810~Transport	٨	٠.٠٠٥٥	SYT13,SLC7A14,YWHAH,CALY,SNAP25, UNC13A,SYN2,NDFIP2
GO:0016081~Synaptic vesicle docking	٣	٠.٠١٠٣	SNAP25,UNC13C,UNC13A
GO:0061024~Membrane organization	١٢	٠.٠١٠٣	SYT13,YWHAH,SNAP25,GLRB,CALM3,SN CA, NECAP1,AMPH,REPS2,NSF,CDC42,REEP1
GO:0001505~Regulation of neurotransmitter levels	٧	٠.٠١٠٧	SNAP25,UNC13C,CALM3,SNCA,CADPS, UNC13A,SYN2
GO:0007399~Nervous system development	١٠	٠.٠١٢٧	YWHAH,SNAP25,ADARB1,L1CAM,CCK,C DC42, CA10,UNC13A,NRXN3,ENC1
GO:0007610~Behavior	١٠	٠.٠١٤٦	SNAP25,GLRB,PLK2,UCHL1,HMGCR,GLS, GABRA5,ADARB1,CCK,NRXN3
GO:0048699~Generation of neurons	١١	٠.٠٢٦٦	YWHAH,SNAP25,RTN1,PLK2,ADARB1,L1 CAM, CCK,CDC42,UNC13A,NRXN3,ENC1
GO:0009987~Cellular process	١٠	٠.٠٣٤١	SYT13,SLC7A14,YWHAH,CALY,SNAP25, UNC13C,TUSC3,UBE2V2,UNC13A,NDFIP2
GO:0051049~Regulation of transport	١٢	٠.٠٣٤٢	HMGCR,CALM3,MAP2K1,SNCA,FABP3,C ADPS,CCK,NSF,CDC42,UNC13A,REEP1,N DFIP2
GO:0050890~Cognition	٧	٠.٠٤٣	SNAP25,PLK2,HMGCR,GABRA5,CCK,TUS C3, NRXN3
GO:0048278~Vesicle docking	٤	٠.٠٤٤٤	SNAP25,UNC13C,NSF,UNC13A

١
٢
٣
٤
٥
٦

جدول ٤: مسیرهای بیولوژیکی شناسایی‌شده با KEGG و براساس ژن‌های مشترک شناسایی‌شده برای آلزایمر

عنوان مسیر	تعداد	p-value	ژن‌ها
hsa04721:Synaptic vesicle cycle	٦	٧.٧٦E-٠٦	NSF, UNC13C, SNAP25, UNC13A, ATP6V1G2, ATP6V1B2
hsa05120:Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection	٤	٠.٠٠٣٢٦٧	CDC42, MAP2K4, ATP6V1G2, ATP6V1B2
hsa04727:GABAergic synapse	٤	٠.٠٠٦٣٧٧	NSF, GNG3, GABRA5, GLS
hsa04912:GnRH signaling pathway	٤	٠.٠٠٧٧٠٢	CDC42, MAP2K4, MAP2K1, CALM3
hsa04014:Ras signaling pathway	٥	٠.٠١٧٧٩٤	CDC42, GNG3, MAP2K1, RASGRF2, CALM3

به منظور تفسیر بیشتر ژن‌های مشترک بدست‌آمده، ژن‌ها به پایگاه داده STRING وارد شدند تا با آنالیز شبکه‌ی بدست‌آمده، اطلاعات جامع‌تری در رابطه با خود ژن‌ها و روابط تنظیمی میان آن‌ها بدست آید. با وارد کردن ژن‌ها در STRING، شبکه میانکنش ژن‌ها با استفاده از گره‌ها و یال‌ها رسم شد. شبکه‌ای حاوی ٦٥ گره و ٨٨ یال بدست آمد. شبکه بدست‌آمده در شکل ٤ قابل مشاهده است.



شکل ٤: شبکه ژنی برای ژنهای مشترک بدست آمده از دو دیتاست آلزایمر. گره قرمز ژن کلیدی براساس پارامتر درجه(DG) ، گره سبز ژن کلیدی براساس پارامتر مرکزیت بینابینی(BC) و گره‌های زرد نشان‌دهنده ژنهای کلیدی براساس هردو پارامتر می باشند.

با آنالیز شبکه بدست‌آمده می‌توان به ژن‌های کلیدی دست یافت. به این منظور آنالیز شبکه با استفاده از نرم‌افزار Cytpscape و با تکیه بر پارامترهای درجه و مرکزیت بینابینی صورت گرفت. درنهایت با درنظرگرفتن سه مقدار بیشینه برای هرکدام از پارامترها، ٤

ژن *SNAP25* ، *UNC13A* ، *SYN2* و *AMPH* بعنوان ژن‌های کلیدی دخیل در فرایند آلزایمر در ناحیه هیپوکامپ مغز یافت شدند. جزئیات بیشتر درمورد این چهار ژن در جدول ۵ آورده شده‌است.

جدول ۵: ژن‌های کلیدی براساس دو پارامتر درجه(DG) و مرکزیت بینابینی(BC)، و بیان هر ژن در دو دیتاست

پارامتر	ژن	DG	BC	LFC-GSE5281	LFC-GSE48350
درجه	SNAP25	۲۱	۰.۵۲۸۸۵	-۲.۸٤٦۳۳	-۱.۳۵۱۰۲
	SYN2	۱۲	۰.۱۱۳۲٤	-۱.۸۱۹۵۹	-۱.۲۵۵٤۳
	UNC13A	۱۰	۰.۱۷۷٤۷	-۱.٤٤٦۵۲	-۰.۷۲۹۳۵
مرکزیت بینابینی	SNAP25	۲۱	۰.۵۲۸۸۵	-۲.۸٤٦۳۳	-۱.۳۵۱۰۲
	UNC13A	۱۰	۰.۱۷۷٤۷	-۱.٤٤٦۵۲	-۰.۷۲۹۳۵
	AMPH	٦	۰.۱٦۹۱۵	-۲.۱۸۸٤۵	-۱.۱۲۹۸۹

بحث

بیماری آلزایمر از شایع‌ترین بیماری‌های زوال عصبی می‌باشد و تضعیف عملکردهای شناختی در افراد درگیر با این بیماری، نگرانی‌های زیادی را بوجود آورده است که از دست‌دادن تدریجی حافظه از مهم‌ترین آن‌هاست. در آلزایمر بخش‌های مختلف مغز به مرور دست‌خوش تغییر می‌شوند اما ناحیه هیپوکامپ اولین بخشی از مغز است که دچار تحلیل می‌شود. از این‌رو، ناحیه هیپوکامپ بعنوان محوری‌ترین ناحیه در آلزایمر، در مطالعه حاضر مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته‌است.

یکی از بهترین و موثرترین روش‌های یافتن درمان و تشخیص مناسب برای یک بیماری، بررسی کردن تغییرات بیان ژن‌ها با تکیه بر پروفایل بیان ژنی می‌باشد. تکنیک‌های توان بالا بعنوان ابزاری ارزشمند، این امکان را در اختیار قرار می‌دهند تا سطوح اطلاعاتی مختلف یعنی ژنوم، ترنسکریپتوم، پروتئوم و متابولوم با جزئیات کامل مورد مطالعه قرار گیرد. سطح ترنسکریپتوم بدلیل اینکه حدواسط ژن‌ها و پروتئین‌ها می‌باشد از اهمیت به‌سزایی برخوردار است و به‌منظور مطالعه‌ی پروفایل بیان ژنی به‌کار می‌رود[۳۵].

در مطالعه حاضر دو مجموعه داده که مجموعا شامل ۸۵ نمونه از ناحیه هیپوکامپ مغز بودند، به‌منظور یافتن ژن‌های کلیدی دخیل در آلزایمر انتخاب شدند. با آنالیز تفاوت بیان و سپس استخراج ژن‌های مشترک از دو دیتاست، ۷٤ ژن دارای تفاوت بیان گزارش شد. از این تعداد ۷۱ ژن با کاهش بیان، ۲ ژن با افزایش بیان و یک ژن با الگوی بیانی متفاوت بودند.(جدول‌های ۱و۲).

با دردست‌داشتن لیست ژن‌ها اطلاعات فراتری را می‌توان بدست آورد. با استفاده از پایگاه داده DAVID، مسیرهای دخیل در آلزایمر توسط پایگاه‌های داده GO و KEGG استخراج شدند. دیده شد که ژن‌های مشترک بدست‌آمده در مسیرهایی مانند "synaptic vesicle cycle" ، "neurotransmitter secretion" و "calcium-ion regulated exocytosis" دخیل هستند. این مسیرها در مطالعات صورت‌گرفته بر آلزایمر بعنوان مسیرهای مهم در روند این بیماری گزارش شده‌اند.(جدول‌های ۳ و ٤)[۳۶-۳۸]

شبکه‌های میانکنش ژنی این امکان را فراهم آورده‌اند تا محققین به صورت بصری با استفاده از شبکه‌های ارائه شده، میانکنش میان محصول ژن‌ها و روابط تنظیمی میان آن‌ها در فنوتیپ مورد بررسی را ارزیابی کرده و ژن‌های محوری را شناسایی کنند. پایگاه داده STRING اطلاعات جامعی اعم از ویژگی‌های هر ژن و چگونگی ارتباطات تنظیمی میان ژن‌ها را در اختیار قرار می‌دهد. تحلیل و ارزیابی شبکه ژنی به دست آمده برای ژن‌های شناسایی شده، با استفاده از پارامترهای اشاره شده، ٤ ژن *SNAP25* ، *UNC13A* ، *SYN2* و *AMPH* را بعنوان ژن‌های کلیدی در این بررسی معرفی نمود که اکثر این ژن‌ها در مسیرهای انتقال عصبی بین نورون‌ها دخالت دارند.(جدول ٤ و ٥)

ژن *SYN2* کدکننده‌ی پروتئین *SYN2* یا synapsin-2 می‌باشد که از پروتئین‌های پیش‌سیناپسی است. ژن *SNAP25* پروتئین SNAP25 را کد می‌کند که جزئی از کمپلکس SNARE می‌باشد. این کمپلکس با حضور در انتهای آکسونی نورون پیش‌سیناپسی، وزیکول حاوی انتقال‌دهنده‌های عصبی را به غشای پلاسمایی نورون پیش‌سیناپسی متصل می‌کند و در اگزوسیتوز انتقال دهنده‌های عصبی از نورون پیش‌سیناپسی به فضای سیناپسی نقش دارد. از آنجاییکه اگزوسیتوز ناقل‌های عصبی و انتقال پیام‌های عصبی از نورون‌های پیش‌سیناپسی به پس‌سیناپسی شرط لازم برای عملکرد درست مغز می‌باشد، اختلال در پروتئین‌های پیش سیناپسی از جمله *SYN2* و *SNAP25* موجب کندشدن و نابودی انتقال پیام عصبی می‌شود. کاهش بیان ژن *SNAP25* با ایجاد تغییرات در مسیر انتقال وابسته به گلوتامات انتقال‌دهنده‌های عصبی (این مسیر یکی از مهم‌ترین مسیرهای حافظه می‌باشد)، مسیرهای حافظه را تحت‌تاثیر قرار داده و موجب بروز آلزایمر می‌گردد[۳۹-٤۱]. هم‌چنین گزارش شده‌است که جهش در ژن *SNAP25* باعث تغییر ساختار پروتئین آن و در نتیجه تغییر ساختار و تضعیف عملکرد کمپلکس SNARE و در نتیجه بروز آلزایمر می‌گردد[٤۲]. تحقیقات انجام‌شده نشان داده‌است الیگومریزاسیون پروتئین *αSin* در مغز سبب کاهش بیان ژن *SYN2* و بروز اختلالات در فرآیند حافظه می‌گردد. در نتیجه کاهش بیان ژن *SYN2* باعث کاهش تعداد پروتئین مربوطه می‌شود و پیام‌رسانی عصبی را مختل می‌کند و بر ژن‌های *CREB* و *Nurr1* نیز اثر می‌گذارد که ژن‌های تنظیم‌کننده برای سیناپسین‌ها می‌باشند[٤۳].

تحقیقات صورت‌گرفته نشان داده‌اند که iridoidهای گیاهی با افزایش بیان ژن *SNAP25* موجب افزایش پروتئین‌های سیناپسی و بهبود روند درمانی در افراد در معرض آلزایمر می‌شوند[٤٤]. ژن *AMPH* که پروتئین Amphiphysin را کد می‌کند، با تاثیر در مسیرهایی که پروتئین tau در آن حضور دارد، در روند بیماری آلزایمر دخیل می‌باشد. هم چنین به دلیل حضور پروتئین Amphiphysin در سمت سیتوپلاسمی غشای نورون پس‌سیناپسی، کاهش بیان ژن *AMPH* موجب اختلال در فرآیند اندوسیتوز وابسته به کلاترین انتقال‌دهنده‌های عصبی در نورون پس‌سیناپسی و در نتیجه افزایش احتمال بروز و پیشرفت آلزایمر می‌گردد[٤٥][٤٦]. فعالیت نامناسب پروتئین *UNC13A* که توسط ژن *UNC13A* کد می‌شود، مانع اگزوسیتوز ناقل‌های عصبی میان نورون‌ها می‌شود. علاوه بر آن موجب تغییر ساختار نورون‌های باقیمانده در شبکه عصبی نیز می‌گردد. *UNC13A* ژن هدف مسیر پیام‌رسان ثانویه DAG می‌باشد که در نتیجه‌ی آن، این ژن باعث تنظیم متابولیسم ترشح APP می‌شود و در جلوگیری از تجمعات بتاآمیلوئیدی نقش دارد[٤۷][٤۸]. جهش‌های متفاوت در ژن *UNC13A* باعث تغییرات مختلفی در دومین‌های پروتئین *UNC13A* می‌گردد که فرایند رهاسازی انتقال‌دهنده‌های عصبی را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد. بطور مثال جهش در نقاط K603E و R769E پروتئین *UNC13A* موجب تغییر در اتصالات مستقل از کلسیم می‌گردد که منجر به سازوکارهای منتهی به آلزایمر در ناحیه هیپوکامپ مغز می‌شود[٤۹].

بنابراین اطلاعات گردآوری شده نشان می‌دهد کاهش بیان ژن‌های کلیدی معرفی‌شده در این مطالعه و جهش در پروتئین‌های حاصل از این ژن‌ها، بطور مشخصی مسیرهای اساسی دخیل در فرایند حافظه را تحت تاثیر قرار می‌دهد و منجر به بروز آلزایمر می‌گردد.

نتایج بدست‌آمده از این مطالعه در راستای یافته‌های مطالعات قبلی در زمینه‌ی آلزایمر می‌باشد و ژن‌های کلیدی حاصل، در تحقیقات متعددی بعنوان ژن‌های دخیل در آلزایمر در ناحیه هیپوکامپ گزارش شده‌اند. پروتئین UNC13A با اتصال به پروتئین SNAP25 از دومین MUN خود، در تشکیل کمپلکس SNARE نقش بسیار مهمی دارد. درنتیجه هرگونه اختلال در اتصال پروتئینهای UNC13A و SNAP25 به یکدیگر موجب بروز آلزایمر می‌گردد[۵۰][۵۱][۵۲]. ارتباط بین پروتئین SYN2 و رشته‌های اکتین موجب تجمع وزیکول‌های سیناپسی و کمک به رهاسازی آن‌ها می‌شود. درنتیجه ضعف در عملکرد این پروتئین یا کاهش بیان ژن کدکننده‌ی آن باعث ضعف در پیام‌رسانی بین نورون‌ها و اختلالات شناختی و حافظه در آلزایمر می‌گردد[۵۳].

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نگرش جدیدی در رابطه با ارتباطات ژن‌های دخیل در آلزایمر گزارش کرده‌است. بطوریکه ژن‌های معرفی‌شده در این مطالعه، در فرایندهای مجزا اما مرتبط باهم نقش دارند. فرایندهای رهاسازی و اگزوسیتوز انتقال‌دهنده‌های عصبی، چرخه‌ی وزیکول سیناپسی و اندوسیتوز فرایندهای مجزا از یکدیگر می‌باشند اما ارتباط تنگاتنگی با یکدیگر دارند و از مسیرهای اساسی در کارکرد حافظه محسوب می‌شوند. تغییر بیانی و جهش در ژن‌ها و تغییر در پروتئین‌های حاضر در هرکدام از این مسیرها، مسیرهای دیگر را تحت تاثیر قرار داده و موجب عدم ارتباط صحیح میان نورون‌ها و بروز آلزایمر می‌گردد. بنابراین مطالعه حاضر ارتباط تنگاتنگ میان مسیرهای دخیل در آلزایمر را آشکار ساخته و نگرشی جامع در رابطه با فرایندهای موثر در این بیماری ارائه داده‌است. اگرچه تابه‌امروز درمانی قطعی برای آلزایمر ارائه نشده‌است، به‌کاربردن این نگرش می‌تواند در تحقیقات آلزایمر مورد توجه بسیار قرار گیرد. لذا ژن‌های کلیدی گزارش‌شده در این مطالعه، مارکرهای بالقوه جهت توسعه روش‌های تشخیصی و درمانی آلزایمر به حساب می‌آیند.

منابع

[1] "2020 Alzheimer's disease facts and figures," *Alzheimers. Dement.*, vol. 16, no. 3, pp. 391–460, Mar. 2020.

[2] Y. Wei, "Comparative transcriptome analysis of the hippocampus from sleep-deprived and Alzheimer's disease mice," *Genet. Mol. Biol.*, vol. 43, no. 2, 2020.

[3] M. T. Heneka *et al.*, "Neuroinflammation in Alzheimer's disease," *Lancet. Neurol.*, vol. 14, no. 4, pp. 388–405, Apr. 2015.

[4] M. Nikolac Perkovic and N. Pivac, "Genetic Markers of Alzheimer's Disease," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1192, pp. 27–52, 2019.

[5] M. Cieślik *et al.*, "Alterations of Transcription of Genes Coding Anti-oxidative and Mitochondria-Related Proteins in Amyloid β Toxicity: Relevance to Alzheimer's Disease," *Mol. Neurobiol.*, vol. 57, no. 3, pp. 1374–1388, Mar. 2020.

[6] Y.-J. Liu *et al.*, "Identification of hub genes associated with cognition in the hippocampus of Alzheimer's Disease," *Bioengineered*, vol. 12, no. 2, pp. 9598–9609, Dec. 2021.

[7] D. Heras-Sandoval, J. M. Pérez-Rojas, J. Hernández-Damián, and J. Pedraza-Chaverri, "The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration," *Cell. Signal.*, vol. 26, no. 12, pp. 2694–2701, Dec. 2014.

[8] M. S. Uddin *et al.*, "Autophagy and Alzheimer's Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Implications," *Front. Aging Neurosci.*, vol. 10, no. JAN, Jan. 2018.

[9] M. Magistri, D. Velmeshev, M. Makhmutova, and M. A. Faghihi, "Transcriptomics Profiling of Alzheimer's Disease Reveal Neurovascular Defects, Altered Amyloid-β Homeostasis, and Deregulated Expression of Long Noncoding RNAs," *J. Alzheimers. Dis.*, vol. 48, no. 3, pp. 647–665, Oct. 2015.

[10] J. G. J. van Rooij *et al.*, "Hippocampal transcriptome profiling combined with protein-protein interaction analysis elucidates Alzheimer's disease pathways and genes," *Neurobiol. Aging*, vol. 74, pp. 225–233, Feb. 2019.

[11] A. M. Crist *et al.*, "Transcriptomic analysis to identify genes associated with selective hippocampal vulnerability in Alzheimer's disease," *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, Dec. 2021.

[12] W. Hu, X. Lin, and K. Chen, "Integrated analysis of differential gene expression profiles in hippocampi to identify candidate genes involved in Alzheimer's disease," *Mol. Med. Rep.*, vol. 12, no. 5, pp. 6679–6687, Sep. 2015.

[13] W. S. Liang *et al.*, "Alzheimer's disease is associated with reduced expression of energy metabolism genes in posterior cingulate neurons," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 11, pp. 4441–4446, Mar. 2008.

[14] B. Readhead *et al.*, "Multiscale Analysis of Independent Alzheimer's Cohorts Finds Disruption of Molecular, Genetic, and Clinical Networks by Human Herpesvirus," *Neuron*, vol. 99, no. 1, pp. 64-82.e7, Jul. 2018.

[15] W. S. Liang *et al.*, "Altered neuronal gene expression in brain regions differentially affected by Alzheimer's disease: a reference data set," *Physiol. Genomics*, vol. 33, no. 2, pp. 240–256, Apr. 2008.

[16] N. C. Berchtold *et al.*, "Gene expression changes in the course of normal brain aging are sexually dimorphic," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 40, pp. 15605–15610, Oct. 2008.

[17] N. C. Berchtold, P. D. Coleman, D. H. Cribbs, J. Rogers, D. L. Gillen, and C. W. Cotman, "Synaptic genes are extensively downregulated across multiple brain regions in normal human aging and Alzheimer's disease," *Neurobiol. Aging*, vol. 34, no. 6, pp. 1653–1661, Jun. 2013.

[18] D. H. Cribbs *et al.*, "Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: a microarray study," *J. Neuroinflammation*, vol. 9, Jul. 2012.

[19] G. Astarita *et al.*, "Deficient liver biosynthesis of docosahexaenoic acid correlates with cognitive impairment in Alzheimer's disease," *PLoS One*, vol. 5, no. 9, pp. 1–8, 2010.

[20] L. J. Blair *et al.*, "Accelerated neurodegeneration through chaperone-mediated oligomerization of tau," *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 10, pp. 4158–4169, Oct. 2013.

[21] M. Goedert, D. S. Eisenberg, and R. A. Crowther, "Propagation of Tau Aggregates and Neurodegeneration," *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 40, pp. 189–210, Jul. 2017.

[22] M. Sárvári *et al.*, "Menopause leads to elevated expression of macrophage-associated genes in the aging frontal cortex: rat and human studies identify strikingly similar changes," *J. Neuroinflammation*, vol. 9, Dec. 2012.

[23] S. R. Piccolo, Y. Sun, J. D. Campbell, M. E. Lenburg, A. H. Bild, and W. E. Johnson, "A single-sample microarray normalization method to facilitate personalized-medicine workflows," *Genomics*, vol. 100, no. 6, pp. 337–344, Dec. 2012.

[24] B. Neupane, D. Richer, A. J. Bonner, T. Kibret, and J. Beyene, "Network meta-analysis using R: A review

of currently available automated packages," *PLoS One*, vol. 9, no. 12, 2014.

[25] G. Alterovitz, M. Xiang, M. Mohan, and M. F. Ramoni, "GO PaD: the Gene Ontology Partition Database," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. Database issue, Jan. 2007.

[26] M. Kanehisa, Y. Sato, M. Kawashima, M. Furumichi, and M. Tanabe, "KEGG as a reference resource for gene and protein annotation," *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. D1, pp. D457–D462, 2016.

[27] M. Kanehisa and S. Goto, "KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes," *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 1, pp. 27–30, Jan. 2000.

[28] D. W. Huang *et al.*, "DAVID Bioinformatics Resources: Expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. SUPPL.2, 2007.

[29] C. von Mering, M. Huynen, D. Jaeggi, S. Schmidt, P. Bork, and B. Snel, "STRING: a database of predicted functional associations between proteins," *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 1, pp. 258–261, Jan. 2003.

[30] D. Szklarczyk *et al.*, "The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets," *Nucleic Acids Res.*, vol. 49, no. D1, pp. D605–D612, Jan. 2021.

[31] D. Szklarczyk *et al.*, "The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. Database issue, pp. D362–D368, Jan. 2017.

[32] S. Killcoyne, G. W. Carter, J. Smith, and J. Boyle, "Cytoscape: a community-based framework for network modeling," *Methods Mol. Biol.*, vol. 563, pp. 219–239, 2009.

[33] P. Shannon *et al.*, "Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks.," *Genome Res.*, vol. 13, no. 11, pp. 2498–2504, Nov. 2003.

[34] N. T. Doncheva, J. H. Morris, J. Gorodkin, and L. J. Jensen, "Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data," *J. Proteome Res.*, vol. 18, no. 2, pp. 623–632, 2019.

[35] J. A. Reuter, D. V. Spacek, and M. P. Snyder, "High-throughput sequencing technologies," *Mol. Cell*, vol. 58, no. 4, pp. 586–597, May 2015.

[36] S. V. Ovsepian, V. B. O'Leary, L. Zaborszky, V. Ntziachristos, and J. O. Dolly, "Synaptic vesicle cycle and amyloid β: Biting the hand that feeds," *Alzheimers. Dement.*, vol. 14, no. 4, pp. 502–513, Apr. 2018.

[37] C. Peña-Bautista *et al.*, "Early neurotransmission impairment in non-invasive Alzheimer Disease detection," *Sci. Reports 2020 101*, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, Oct. 2020.

[38] Y. Wang, Y. Shi, and H. Wei, "Calcium Dysregulation in Alzheimer's Disease: A Target for New Drug Development," *J. Alzheimer's Dis. Park.*, vol. 7, no. 5, 2017.

[39] L. Nie *et al.*, "Ginsenoside Rg1 Ameliorates Behavioral Abnormalities and Modulates the Hippocampal Proteomic Change in Triple Transgenic Mice of Alzheimer's Disease," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2017, Oct. 2017.

[40] S. Hilfiker, V. A. Pieribone, A. J. Czernik, H. T. Kao, G. J. Augustine, and P. Greengard, "Synapsins as regulators of neurotransmitter release," *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 354, no. 1381, pp. 269–279, Feb. 1999.

[41] Q. Hou *et al.*, "SNAP-25 in hippocampal CA1 region is involved in memory consolidation," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 20, no. 6, pp. 1593–1603, Sep. 2004.

[42] S. Karmakar, L. G. Sharma, A. Roy, A. Patel, and L. M. Pandey, "Neuronal SNARE complex: A protein folding system with intricate protein-protein interactions, and its common neuropathological hallmark, SNAP25," *Neurochem. Int.*, vol. 122, pp. 196–207, Jan. 2019.

[43] M. E. Larson *et al.*, "Selective lowering of synapsins induced by oligomeric α-synuclein exacerbates

memory deficits," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, no. 23, pp. E4648–E4657, Jun. 2017.

[44] B. Dinda, M. Dinda, G. Kulsi, A. Chakraborty, and S. Dinda, "Therapeutic potentials of plant iridoids in Alzheimer's and Parkinson's diseases: A review," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 169, pp. 185–199, May 2019.

[45] J. Chapuis *et al.*, "Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology," *Mol. Psychiatry*, vol. 18, no. 11, pp. 1225–1234, Nov. 2013.

[46] P. Wigge and H. T. McMahon, "The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse," *Trends Neurosci.*, vol. 21, no. 8, pp. 339–344, Aug. 1998.

[47] F. P. Diekstra *et al.*, "C9orf72 and UNC13A are shared risk loci for amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a genome-wide meta-analysis," *Ann. Neurol.*, vol. 76, no. 1, pp. 120–133, 2014.

[48] S. Rossner *et al.*, "Munc13-1-mediated vesicle priming contributes to secretory amyloid precursor protein processing," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 27, pp. 27841–27844, Jul. 2004.

[49] M. Camacho *et al.*, "Control of neurotransmitter release by two distinct membrane-binding faces of the Munc13-1 C 1 C 2 B region," *Elife*, vol. 10, Nov. 2021.

[50] R. V. Kalyana Sundaram *et al.*, "Munc13 binds and recruits SNAP25 to chaperone SNARE complex assembly," *FEBS Lett.*, vol. 595, no. 3, pp. 297–309, Feb. 2021.

[51] A. Margiotta, "Role of SNAREs in Neurodegenerative Diseases," *Cells*, vol. 10, no. 5, May 2021.

[52] V. Quarato *et al.*, "Transcriptional Profiling of Hippocampus Identifies Network Alterations in Alzheimer’s Disease," *Applied Sciences* , vol. 12, no. 10. 2022.

[53] K. Bonnycastle, E. C. Davenport, and M. A. Cousin, "Presynaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders: Insights from the synaptic vesicle life cycle," *J. Neurochem.*, vol. 157, no. 2, pp. 179–207, Apr. 2021.